

26 APR 2005

10/532670

日本特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

PCT/JP 03/13838

REC'D 21 NOV/2003
29.10.03

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

2002年10月31日

出願番号
Application Number:

特願2002-316942

[ST. 10/C]:

[JP 2002-316942]

出願人
Applicant(s):

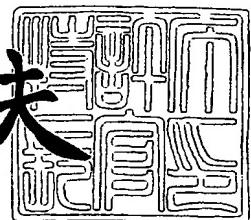
日本化薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年10月17日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2003-3085669

【書類名】 特許願
【整理番号】 NKM1886
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A61K 47/48
【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県北葛飾郡庄和町大字新宿新田225-104
【氏名】 北川 正行

【発明者】
【住所又は居所】 東京都足立区千住1-29-1-707
【氏名】 岡本 一也

【特許出願人】
【識別番号】 000004086
【氏名又は名称】 日本化薬株式会社
【代表者】 中村 輝夫
【電話番号】 03-3237-5234

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 010319
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 明細書 1
【物件名】 要約書 1
【プルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】カンプトテシン類の高分子誘導体

【特許請求の範囲】

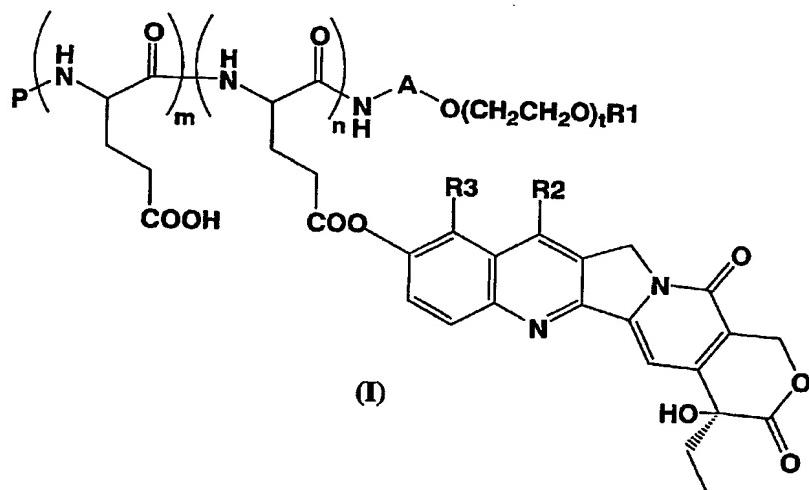
【請求項 1】カンプトテシン類のフェノール性水酸基と、ポリエチレングリコール類部分及びカルボン酸基を有するポリマーのカルボン酸基が、エステル結合していることを特徴とするカンプトテシン類の高分子誘導体。

【請求項 2】ポリマーが、ポリエチレングリコール類と側鎖にカルボン酸基を有するポリマーとのブロック共重合体である請求項 1 記載のカンプトテシン類の高分子誘導体。

【請求項 3】側鎖にカルボン酸基を有するポリマーがポリグルタミン酸又はポリアスパラギン酸である請求項 2 記載のカンプトテシン類の高分子誘導体。

【請求項 4】一般式 (I)

【化1】



[式中、R 1 は水素原子又は (C 1 ~ C 6) アルキル基を示し、A は結合基を示し、 $m + n$ は 3 ~ 200 の整数を示し、t は 5 ~ 11500 の整数を示し、R 2 は水素原子、置換基を有していてもよい (C 1 ~ C 6) アルキル基又は置換基を有していてもよいシリル基を示し、R 3 は水素原子又は置換基を有していてもよい (C 1 ~ C 6) アルキル基を示し、P は水素原子、(C 1 ~ C 6) アシル基又は (C 1 ~ C 6) アルコキシリカルボニル基を示す] で表されるカンプトテシン

類の高分子誘導体。

【請求項5】 R₁が(C₁～C₄)アルキル基であり、Aが(C₂～C₆)アルキレン基であり、m+nが6～60の整数であり、tが100～300の整数であり、R₂が水素原子又は無置換の(C₁～C₄)アルキル基であり、R₃が置換基を有していてもよい(C₁～C₄)アルキル基又は水素原子であり、Pが(C₂～C₄)アシル基である請求項4記載のカンプトテシン類の高分子誘導体。

【請求項6】 R₁がメチル基であり、Aがトリメチレン基であり、m+nが6～60の整数であり、tが100～300の整数であり、R₂が水素原子であり、R₃がジメチルアミノメチル基であり、Pがアセチル基である請求項5記載のカンプトテシン類の高分子誘導体。

【請求項7】 R₁がメチル基であり、Aがトリメチレン基であり、m+nが6～60の整数であり、tが100～300の整数であり、R₂がエチル基であり、R₃が水素原子であり、Pがアセチル基である請求項5記載のカンプトテシン類の高分子誘導体。

【請求項8】 ポリエチレングリコール類部分及びカルボン酸基を有するポリマーのカルボン酸基と、カンプトテシン類のフェノール性水酸基を、縮合剤を用いてエステル結合させることを特徴とする請求項1～7のいずれか1項に記載のカンプトテシン類の高分子誘導体の製造法。

【請求項9】 請求項1～7のいずれか1項に記載のカンプトテシン類の高分子誘導体を含有する抗癌剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はカンプトテシン類の高分子誘導体、その製造方法及びその用途に関する。

【0002】

【従来の技術】

カンプトテシン(Camptothecin)は、中国原産の喜樹等の植物に含有されている抗腫瘍性アルカロイドであるが、水に極めて難溶性であるため、臨床上使用可

能な水溶性誘導体の研究が行われてきた。又、ベンゼン環上への水酸基、アルコキシリ基やアミノ基等の置換基の導入は、効果を増強することが知られていた。

(非特許文献1)

【0003】

例えば、特許文献1や特許文献2にはポリエチレングリコールを結合したプロドラッグとしての高分子誘導体について言及されている。これらの特許では、ポリエチレングリコール類部分の分子量の最適化と同時に、ポリエチレングリコール類部分とカンプトテシンを結合するスペーサーの重要性について報告している。スペーサーは、誘導体が生体を滞留している間は安定に存在し、標的部位でのみ、すみやかに切断されることが望ましい。これらの文献では、単なるアルコールのエステル結合体では標的部位での加水分解速度が遅く十分な薬物濃度を得ることができないとして、標的部位で加水分解されやすいスペーサーを開示している。

又、カンプトテシンの水溶性誘導体としてCPT-11(7-エチル-10-ピペリジノピペリジノカルボニルオキシカンプトテシン)が知られている(非特許文献1)。

更に、特許文献3には、カンプトテシン類にポリグルタミン酸が結合した高分子誘導体が記載されている。

【0004】

一方、特許文献4及び非特許文献2にはポリエチレングリコールとポリアスパラギン酸のブロック共重合体に薬剤を結合した分子の集合体がミセルを形成して水溶性が増し、ポリマー1分子あたりの薬剤含有量を増加することができる事が示されており、特許文献5には具体的にはポリエチレングリコール類とポリグルタミン酸とのブロック共重合体の側鎖カルボン酸に抗癌性物質を結合した高分子抗癌剤が示されており、特許文献6にはポリエチレングリコール類とポリ酸性アミノ酸とのブロック共重合体の側鎖カルボン酸に疎水性物質を結合した高分子薬物運搬体が示されている。しかしながら、特許文献4、特許文献5及び特許文献6には、カンプトテシン類の結合体については記載されていない。

【0005】

【特許文献1】

特表平10-513187号公報

【特許文献2】

特表2000-517304号公報

【特許文献3】

国際公開第01/70275号パンフレット

【特許文献4】

特許第2694923号公報

【特許文献5】

特開平5-955号公報

【特許文献6】

特許第3268913号公報

【非特許文献1】

宮坂貞、抗がん剤イリノテカン、現代化学、東京化学同人、1999年、10月号、58頁～66頁

【非特許文献2】

T. Nakanishi等、Development of the polymer micelle carrier system for doxorubicin、Journal of Controlled Release、Elsevier、2001年、74巻、295頁～302頁

【0006】**【発明が解決しようとする課題】**

特許文献1や特許文献2に記載されたポリエチレングリコールが結合したプロドラッグは、構造上ポリエチレングリコール1分子に対して1～2個の薬剤しか結合できず、その結果、有効量の薬剤を投与するためには大量のポリマーの投与が必要である。

【0007】

又、カンプトテシンの水溶性誘導体であるCPT-11は、重篤な副作用があり使いやすい薬剤ではなく、新規なカンプトテシン誘導体が求められている。

特許文献4、特許文献5及び非特許文献2に具体的に記載されているアドリア

マイシン結合体は、ブロック共重合体とアドリアマイシン残基が化学的に安定な結合様式であるアミド結合で結合されており、非特許文献2に記載のように結合したアドリアマイシンは抗腫瘍活性を有しない。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は前記したような課題を解決すべく銳意努力した結果、カンプトテシン類に、ポリエチレングリコール類部分とカルボン酸基を有するポリマーのカルボン酸基を、フェニルエステル結合することにより得られる高分子誘導体を見出し、本発明を完成した。

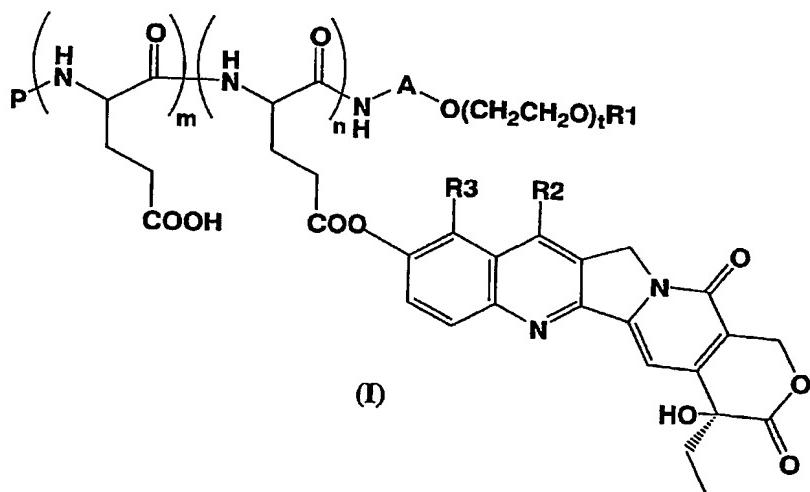
【0009】

即ち、本発明は、

- (1) カンプトテシン類のフェノール性水酸基と、ポリエチレングリコール類部分及びカルボン酸基を有するポリマーのカルボン酸基が、エステル結合していることを特徴とするカンプトテシン類の高分子誘導体；
- (2) ポリマーが、ポリエチレングリコール類と側鎖にカルボン酸基を有するポリマーとのブロック共重合体である上記(1)記載のカンプトテシン類の高分子誘導体；
- (3) 側鎖にカルボン酸基を有するポリマーがポリグルタミン酸又はポリアスパラギン酸である上記(2)記載のカンプトテシン類の高分子誘導体；
- (4) 一般式(I)

【0010】

【化2】



【0011】

[式中、R₁は水素原子又は(C₁～C₆)アルキル基を示し、Aは結合基を示し、m+nは3～200の整数を示し、tは5～11500の整数を示し、R₂は水素原子、置換基を有していてもよい(C₁～C₆)アルキル基又は置換基を有していてもよいシリル基を示し、R₃は水素原子又は置換基を有していてもよい(C₁～C₆)アルキル基を示し、Pは水素原子、(C₁～C₆)アシル基又は(C₁～C₆)アルコキシリカルボニル基を示す]で表されるカンプトテシン類の高分子誘導体；

【0012】

(5) R₁が(C₁～C₄)アルキル基であり、Aが(C₂～C₆)アルキレン基であり、m+nが6～60の整数であり、tが100～300の整数であり、R₂が水素原子又は無置換の(C₁～C₄)アルキル基であり、R₃が置換基を有していてもよい(C₁～C₄)アルキル基又は水素原子であり、Pが(C₂～C₄)アシル基である上記(4)記載のカンプトテシン類の高分子誘導体；

(6) R₁がメチル基であり、Aがトリメチレン基であり、m+nが6～60の整数であり、tが100～300の整数であり、R₂が水素原子であり、R₃がジメチルアミノメチル基であり、Pがアセチル基である上記(5)記載のカンプトテシン類の高分子誘導体；

【0013】

(7) R₁がメチル基であり、Aがトリメチレン基であり、m+nが6～60の整数であり、tが100～300の整数であり、R₂がエチル基であり、R₃が水素原子であり、Pがアセチル基である上記(5)記載のカンプトテシン類の高分子誘導体；

(8) ポリエチレングリコール類部分及びカルボン酸基を有するポリマーのカルボン酸基と、カンプトテシン類のフェノール性水酸基を、縮合剤を用いてエステル結合させることを特徴とする上記(1)～(7)のいずれか1項に記載のカンプトテシン類の高分子誘導体の製造法；

(9) 上記(1)～(7)のいずれか1項に記載のカンプトテシン類の高分子誘導体を含有する抗癌剤；

に関する。

【0014】**【発明の実施の形態】**

本発明のカンプトテシン類の高分子誘導体は、カンプトテシン類のフェノール性水酸基と、ポリエチレングリコール類部分及びカルボン酸基を有するポリマーのカルボン酸基とが、フェニルエステル結合していることを特徴とする。

本発明におけるカンプトテシン類としては、フェノール性水酸基を有し、且つ抗腫瘍活性を有するカンプトテシン誘導体であれば特に限定されない。フェノール性水酸基は、カンプトテシンの9位、10位、11位及び12位から選ばれる任意の1～4個の位置に結合している。具体的には例えば、7-エチル-10-ヒドロキシーカンプトテシンやトポテカン(9-ジメチルアミノメチル-10-ヒドロキシーカンプトテシン、グラクソ・スミスクライン製)等が挙げられる。

本発明におけるポリエチレングリコール部分とカルボン酸を有するポリマーには、ポリニチレングリコール部分とカルボン酸が、主鎖ポリマーから枝分かれしたグラフト型ポリマーや、ポリエチレングリコール類とポリカルボン酸ポリマーが結合したブロック型ポリマー等が含まれる。

【0015】

グラフト型ポリマーとしては、例えば特開平11-279083号公報に記載

のポリエチレングリコールとアクリル酸類の縮合物と、アクリル酸類あるいは無水マレイン酸等を共重合反応に供し、必要に応じて加水分解反応に付すこと等によって得られるポリマーが挙げられる。又、ブロック型ポリマーとしては、末端に官能基を有するポリエチレングリコール類と末端に官能基を有するポリカルボン酸類を結合したポリマーや、特許文献5に記載されている、末端にアミノ基を有するポリエチレングリコール類で重合を開始する、アミノ酸活性化物の重合反応によって得られるポリマーが挙げられる。

【0016】

本発明におけるポリエチレングリコール類には、両末端又は片末端が修飾されたポリエチレングリコールも含まれ、両末端の修飾基は同一でも異なっていてもよい。末端の修飾基としては、置換基を有していてもよい(C1～C6)アルキル基が挙げられる。置換基を有していてもよい(C1～C6)アルキル基のアルキル基としては、好ましくは(C1～C4)アルキル基が挙げられ、具体的にはメチル基、エチル基、n-プロピル基、i-プロピル基、n-ブチル基、s-ブチル基、t-ブチル基等が挙げられる。置換基を有してもよい(C1～C6)アルキル基の置換基としては、例えばアミノ基、メチルアミノ基、ジメチルアミノ基、エチルアミノ基、ジエチルアミノ基等が挙げられる。

【0017】

ポリエチレングリコール類部分の分子量としては、300～500000程度であり、好ましくは500～100000程度、更に好ましくは1000～50000程度である。

ポリエチレングリコール部分及びカルボン酸を有するポリマーにおけるポリマー1分子あたりのカルボン酸基数は、3～200個が好ましく、特に好ましくは6～60個である。カルボン酸基数はアルカリによる中和滴定から求められる。その際、カルボン酸基にカンプトテシン類がエステル結合している場合等は加水分解後に測定すればよい。

【0018】

又、本発明におけるポリエチレングリコール類部分及びカルボン酸基を有するポリマーの分子量としては、500～500000程度であり、好ましくは、6

00～100000程度であり、更に好ましくは、800～80000である。

なお、本発明において分子量とは、G P C法で測定した重量平均分子量である。
。

本発明において、ポリエチレングリコール類部分及びカルボン酸基を有するポリマーに結合するカンプトテシン類の結合量としては、薬効を示す量であれば特に限定されないが、ポリマーの総カルボン酸基数の1～100%であり、好ましくは10～100%である。

本発明の高分子誘導体は、プロドラッグとして効果を示す誘導体も含む。

【0019】

本発明におけるポリエチレングリコール類部分とカルボン酸を有するポリマーとして好ましくは、ブロック型ポリマーが挙げられ、側鎖にカルボン酸基を有するポリマーとポリエチレングリコール類のブロック共重合体が更に好ましい。側鎖にカルボン酸基を有するポリマーとしては例えば、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリリンゴ酸、ポリアスパラギン酸やポリグルタミン酸等が挙げられ、特に好ましくはポリアスパラギン酸やポリグルタミン酸である。

【0020】

本発明における側鎖にカルボン酸基を有するポリマーとポリエチレングリコール類のブロック共重合体としては、例えば、アルコキシポリエチレングリコールーポリアクリル酸、アルコキシポリエチレングリコールーポリメタクリル酸、アルコキシポリエチレングリコールーポリグルタミン酸、アルコキシポリエチレングリコールーポリアスパラギン酸等が挙げられる。好ましいブロック共重合体としては例えば、(C1～C4)アルコキシポリエチレングリコールーポリアスパラギン酸又は(C1～C4)アルコキシポリエチレングリコールーポリグルタミン酸等である。

【0021】

更に本発明におけるポリエチレングリコール類部分とポリ酸性アミノ酸のブロック共重合体にカンプトテシン類をエステル結合した高分子誘導体としては、例えば、上記一般式(I) [式中、R1は水素原子又は(C1～C6)アルキル基を示し、Aは結合基を示し、m+nは3～200の整数を示し、tは5～11

500の整数を示し、R2は水素原子、置換基を有していてもよい（C1～C6）アルキル基又は置換基を有していてもよいシリル基を示し、R3は水素原子又は置換基を有していてもよい（C1～C6）アルキル基を示し、Pは水素原子、（C1～C6）アシル基又は（C1～C6）アルコキシカルボニル基を示す]が挙げられる。

【0022】

一般式（I）のR1における（C1～C6）アルキル基としては、直鎖又は分岐鎖の（C1～C6）アルキル基が挙げられ、直鎖又は分岐鎖の（C1～C4）アルキル基が好ましく、具体的には例えば、メチル基、エチル基、n-プロピル基、i-プロピル基、n-ブチル基、t-ブチル基等が挙げられ、特にメチル基が好ましい。ポリエチレングリコール類とポリ酸性アミノ酸との結合部分であり、Aで表される結合基としては、生理活性を阻害しない限り特に限定されないが、（C2～C6）アルキレン基が好ましく、具体的には、例えば、エチレン基、トリメチレン基、ブチレン基等が挙げられ、特にトリメチレン基が好ましい。

【0023】

一般式（I）のR2における置換基を有していてもよい（C1～C6）アルキル基の置換基としては、アミノ基、（C1～C3）アルキルアミノ基、ジ（C1～C3）アルキルアミノ基が挙げられる。置換基を有していてもよい（C1～C6）アルキル基のアルキル基としては、上記R1における（C1～C6）アルキル基と同じ基が挙げられる。

【0024】

一般式（I）のR2における置換基を有していてもよいシリル基としては、具体的には例えば、（1, 1-ジメチルエチル）ジメチルシリル基等が挙げられる。

一般式（I）のR2として具体的には、例えば水素原子、メチル基、エチル基、ジメチルアミノメチル基、2-[（1-メチルエチル）アミノ]エチル基、2-(トリメチルシリル)エチル基、(4-メチル-1-ピペリジニル)メチル基、[(2, 3-ジデオキシ- α -D-エリスロ-ヘキシ-2-エノピラノシル)オキシ]メチル基等が挙げられる。R2として好ましくは水素原子又はエチル基で

ある。

【0025】

一般式(I)のR₃における置換基を有していてもよい(C1～C6)アルキル基の置換基としては、上記R₂の置換基を有していてもよい(C1～C6)アルキル基の置換基が挙げられ、R₃における置換基を有していてもよい(C1～C6)アルキル基のアルキル基としては、上記R₁における(C1～C6)アルキル基と同じ基が挙げられる。

一般式(I)のR₃として具体的には、例えば水素原子、メチル基、エチル基、ジメチルアミノメチル基、2-[(1-メチルエチル)アミノ]エチル基等が挙げられる。R₃として好ましくは水素原子又はジメチルアミノメチル基である。

【0026】

一般式(I)のPにおける(C1～C6)アシル基としては、特に限定されないが、例えば、ホルミル基、アセチル基、プロピオニル基、ピバロイル基等が挙げられ、アセチル基が好ましい。

一般式(I)のPにおける(C1～C6)アルコキシリカルボニル基としては、特に限定されないが、例えば、メトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、t-ブトキシカルボニル基等が挙げられる。

【0027】

一般式(I)のm+nとしては、3～200の整数であるが、好ましくは6～60の整数、更に好ましくは6～40の整数である。カンプトテシン類の結合したポリグルタミン酸と遊離のポリグルタミン酸は、ブロック重合型であっても、ランダム重合型であってもよい。m+nは上記のポリマー1分子中のカルボン酸基数である。ポリマー中のカンプトテシン類の結合したグルタミン酸基数nは、紫外線吸収スペクトルの強度から求めることができる。

一般式(I)のtとしては、5～11500程度の整数であるが、好ましくは8～2300程度の整数であり、更に好ましくは16～1200程度である。tは、ポリエチレングリコール類部分及びカルボン酸基を有するポリマーの分子量から、上記カルボン酸基数に基づくカルボン酸基を有する部分ポリマーの分子量

を除くことにより求めることもできる。

上記ポリエチレングリコール類とカンプトテシン類の結合したポリグルタミン酸とのブロック共重合体は、水中でポリエチレングリコール類を外殻とするミセルを形成してもよい。

【0028】

本発明の高分子誘導体の製造法は、例えば特許文献5に記載の方法に準じて調製されたポリエチレングリコール類-ポリグルタミン酸ブロック共重合体と、副反応を起こす可能性のある活性基を有する場合はその活性基を保護したカンプトテシン類とを、両者が溶解する溶媒中、好ましくは有機溶媒中、より好ましくはN,N-ジメチルホルムアミド(DMF)、1,3-ジメチル-2-イミダゾリジノン(DMI)、N-メチルピロリドン(NMP)等の水溶性極性溶媒中、0~180℃、好ましくは5~50℃でジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、ジイソプロピルカルボジイミド(DIPC)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(WSC)、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリノン(EDQ)等の縮合剤を用いた反応に付すことにより為される。縮合反応の際に、N,N-ジメチルアミノピリジン(DMAP)等の反応補助剤を用いてもよい。反応後、必要に応じて脱保護を行い、通常の分離等のための操作によりカンプトテシン類の高分子誘導体を製造することができる。ただし、本発明の高分子誘導体の製造法は上記の方法に限定されるわけではない。

【0029】

本発明の高分子誘導体は、抗癌剤として使用される。本発明の高分子誘導体は、注射剤、錠剤、散剤等通常使用されている剤型に製剤化することにより使用され得る。製剤化に当っては、通常使用されている薬学的に許容される担体、例えば結合剤、滑沢剤、崩壊剤、溶剤、賦形剤、可溶化剤、分散剤、安定化剤、懸濁化剤、保存剤、無痛化剤、色素、香料等が使用できる。注射剤の場合は、通常溶剤を使用する。溶剤としては、例えば水、生理食塩水、5%ブドウ糖又はマンニトール液、水溶性有機溶媒、例えばグリセロール、エタノール、ジメチルスルホキシド、N-メチルピロリドン、ポリエチレングリコール、クレモフォア等、及

びそれらの混合液、並びに水と該水溶性有機溶媒の混合液等が挙げられる。

【0030】

本発明のカンプトテシン類の高分子誘導体の投与量は、患者の性別、年齢、生理的状態、病態等により当然変更され得るが、非経口的に、通常、成人1日当たり、活性成分として $0.01 \sim 500 \text{ mg/m}^2$ 、好ましくは $0.1 \sim 250 \text{ mg/m}^2$ を投与する。注射による投与は、静脈、動脈、患部（腫瘍部）等に行われる。

【0031】

【実施例】

以下、本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明がこれらの実施例に限定されるものではない。

【0032】

実施例1 化合物1（分子量約12000のメトキシポリエチレングリコールと重合数が約28のポリグルタミン酸のブロック共重合体と、7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンとの縮合体：一般式（I）のR1=Me、A=トリメチレン基、m+n=約28、t=約273、R2=Et、R3=H、P=Ac）の合成

下記参考例1に記載した、メトキシポリエチレングリコール-ポリグルタミン酸ブロック共重合体（210mg）及び、特公昭62-47193号公報に記載された方法にて製造した、7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン（80mg）をDMF（14ml）に溶解し、DMAP（13.5mg）、DIPC（0.116ml）を加え、室温にて20時間攪拌した。反応液にエタノール（40ml）及びジイソプロピルエーテル（160ml）を加え、室温にて30分攪拌した後、沈析物を濾取し、エタノール/ジイソプロピルエーテル（1/4(v/v)、150ml）で、洗浄した。得られた沈析物を、アセトニトリル/水（1/3(v/v)、40ml）に溶解後、イオン交換樹脂（ダウエックス50（H⁺）、5ml）に通塔し、アセトニトリル/水（1/3(v/v)、40ml）にて、溶出した。得られた溶出画分から、アセトニトリルを減圧下留去したのち、凍結乾燥することによって、化合物1（270mg）を得た。本化合物のカ

ンプトテシン類の含量を、DMF溶液中での330nmにおける吸光度に基づいて定量したところ、25.4% (w/w) であった。又、上記で得られた化合物1について高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析したところ、遊離のカンプトテシン類は0.3%以下の含量であった。

【0033】

実施例2 化合物2（分子量約12000のモノメトキシポリエチレングリコールと重合数が約7のポリグルタミン酸のブロック共重合体と、7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンとの縮合体：一般式(I)のR1=Me、A=トリメチレン基、m+n=約7、t=約273、R2=Et、R3=H、P=Ac）の合成

下記参考例2に記載した、メトキシポリエチレングリコール-ポリグルタミン酸(797mg)及び、特公昭62-47193号公報に記載された方法にて製造した、7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン(80mg)をDMF(14ml)に溶解し、DMAP(16.6mg)、DIPC(0.142ml)を加え、室温にて20時間攪拌した。反応液にエタノール(40ml)及びジイソプロピルエーテル(160ml)を加え、室温にて30分攪拌した後、沈析物を濾取し、エタノール/ジイソプロピルエーテル(1/4(v/v)、150ml)で、洗浄した。得られた沈析物を、アセトニトリル/水(1/3(v/v)、40ml)に溶解後、イオン交換樹脂(ダウエックス50(H⁺)、5ml)に通塔し、アセトニトリル/水(1/3(v/v)、40ml)にて、溶出した。得られた溶出画分から、アセトニトリルを減圧下留去したのち、凍結乾燥することによって、化合物2(818mg)を得た。本化合物のカンプトテシン類の含量を、DMF溶液中での330nmにおける吸光度に基づいて定量したところ、9.6% (w/w) であった。又、上記で得られた化合物2についてHPLCで分析したところ、遊離のカンプトテシン類は0.2%以下の含量であった。

【0034】

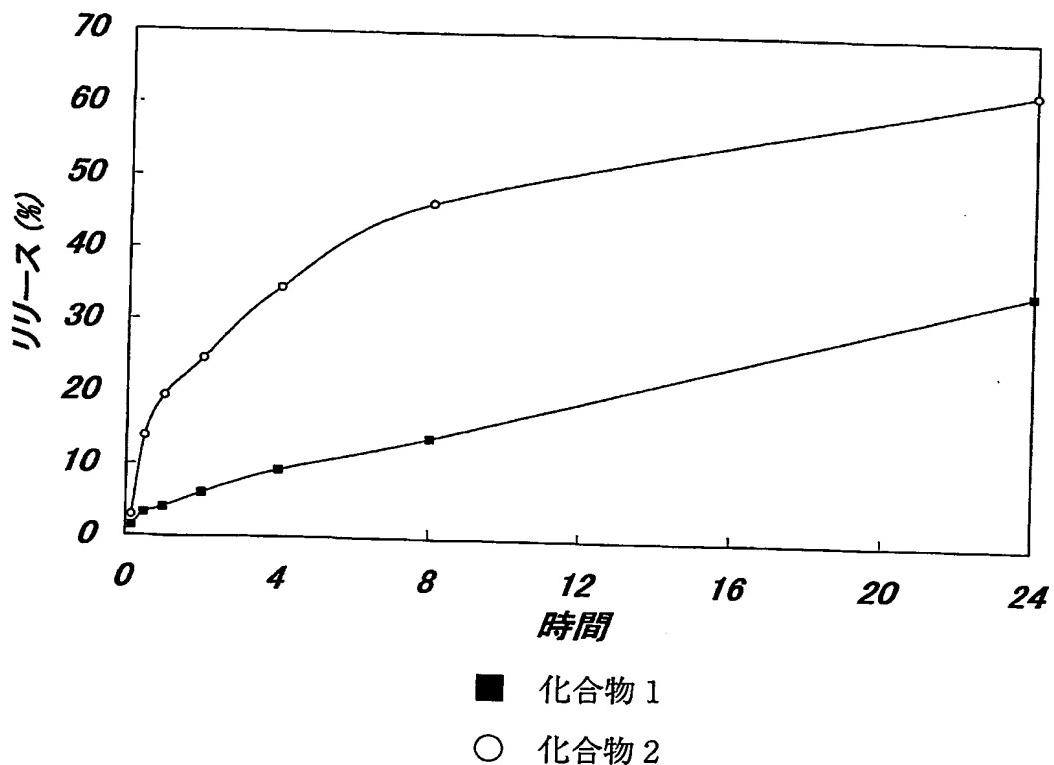
実施例3 酵素非存在状態における薬剤放出

実施例1、2のカンプトテシン類の高分子誘導体を、PBS(リン酸緩衝生理食塩水；pH7.1)に溶解し、37℃にてインキュベートした。該高分子より

放出された7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンを、HPLCにて分離・測定した。本処理における標準曲線と比較して、7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンの量を計算した。その値を高分子プロドラッグの薬剤含有量から求めた全薬剤量の比として図1に示した。図1は、本発明の高分子誘導体から、酵素に依存せずに薬物が徐放されることを示している。

【0035】

【図1】



【0036】

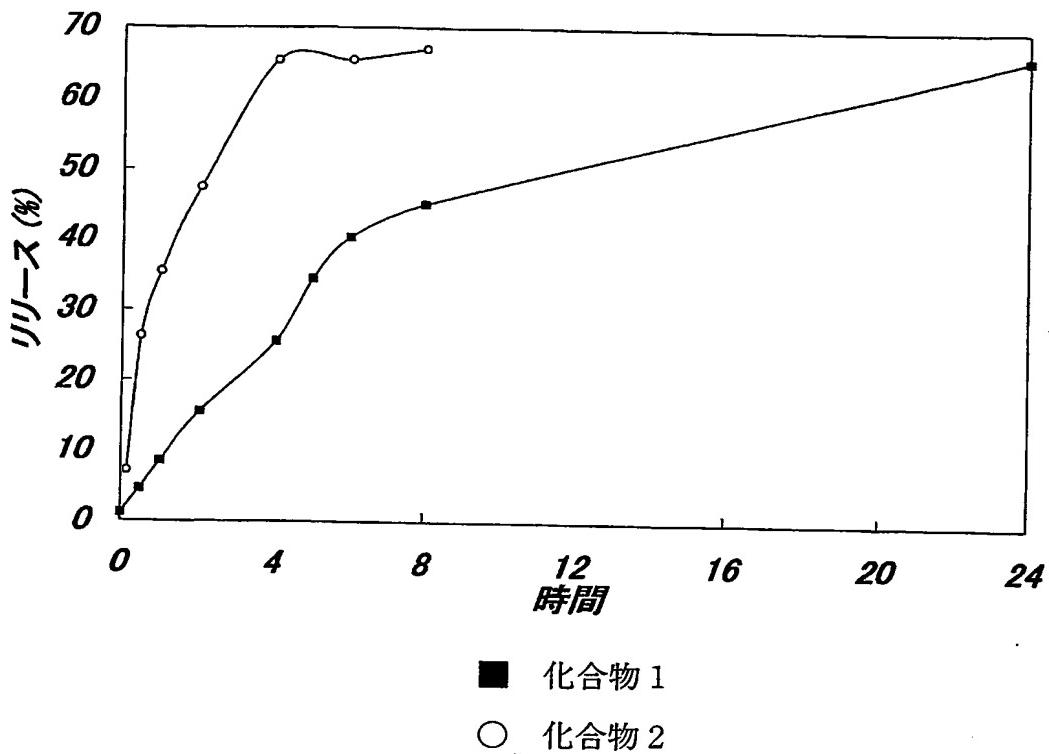
実施例4 血漿存在状態における薬剤放出

実施例1、2のカンプトテシン類の高分子誘導体を、5%グルコース水溶液に溶解後、マウス（オス）血漿を、5%グルコース水溶液の4倍量（v/v）加え、37℃にてインキュベートした。その後、0.1mLづつを経時的に取り出し、メタノール/アセトニトリル（1/1 (v/v)、0.4mL）を加えて除タンパク処理を行い、該高分子より放出された7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンを、HPLCにて分離・測定した。本処理における標準曲線と比較して、7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンの量を計算した。その値を高

分子プロドラッグの薬剤含有量から求めた全薬剤量の比として図2に示した。図2は本発明の高分子誘導体から、血漿中でも薬物が徐放されることを示している。

【0037】

【図2】



【0038】

実施例5 抗腫瘍作用

マウス皮下で継代しているマウス大腸癌Colon26腫瘍を約2mm角のブロックにし、套管針を用いてマウス皮下に移植した。腫瘍移植後7日目に本発明の高分子誘導体及び対照薬（CPT-11）を各々5%グルコース水溶液にて溶解し、単回静脈内に投与した。投与後、腫瘍の長径（L mm）及び短径（W mm）を、キャリパーを用いて2～3日間隔で計測し、腫瘍体積を $(L \times W^2) / 2$ により計算し、投与開始日の体積から相対腫瘍体積を求めた（表1）。又、毒性の指標として、体重の変動も調べた（表2）。その結果、本発明の高分子誘導体は、毒性（体重減少）は少なく、CPT-11に比較して抗腫瘍効果が増強されていた。又、薬剤含有量が多い高分子誘導体（化合物1）は、薬剤含有量が少ない高分子誘導体（化合物2）に比較して、より高い抗腫瘍効果を示していた。

子誘導体（化合物2）と比べて、より少ない投与量で高い抗腫瘍効果が得られた。

【0039】

表1

投与量	投与後日数						
	0	2	5	7	9	12	14
無処置群	1.0	2.5	8.1	12.8	14.5	15.5	14.3
化合物1 45.0mg/kg	1.0	0.9	0.4	0.3	0.5	0.9	2.6
	22.5mg/kg	1.0	0.8	0.6	1.0	1.8	7.2
化合物2 180.0mg/kg	1.0	0.8	0.9	1.5	3.8	9.8	13.8
	90.0mg/kg	1.0	1.0	1.4	3.5	8.8	16.5
CPT-11 26.1mg/kg	1.0	1.8	8.4	10.3	12.8	33.2	34.1

【0040】

表2

投与量	投与後日数						
	0	2	5	7	9	12	14
無処置群	1.0	1.01	1.02	0.97	0.89	0.80	0.81
化合物1 45.0mg/kg	1.0	0.94	0.91	0.97	1.01	1.03	1.04
	22.5mg/kg	1.0	0.98	1.02	1.01	1.06	1.03
化合物2 180.0mg/kg	1.0	0.91	0.99	0.99	1.04	0.94	0.94
	90.0mg/kg	1.0	0.96	1.00	1.01	1.01	0.90
CPT-11 26.1mg/kg	1.0	1.00	1.01	0.90	0.79	0.88	0.87

【0041】

参考例1 分子量約12000のモノメトキシポリエチレングリコールと重合数が約28のポリグルタミン酸のブロック共重合体 N-アセチル化物の合成
 片末端メトキシ基片末端3-アミノプロピル基のポリエチレングリコール (SUNBRIGHT MEPA-12T、日本油脂製、平均分子量12000、1.0g) をDMSO (20ml) に溶解後、γ-ベンジル L-グルタメート N-カルボン酸無水物 (0.77g) を加えて35℃にて20時間攪拌した。反応液にエタノール (80ml) 及びジイソプロピルエーテル (320ml) を加え、室温にて90分攪拌した後、沈析物を濾取し、エタノール/ジイソプロピルエーテル (1/4 (v/v) 、100ml) で洗浄した。得られた沈析物をDMF (20ml) に溶解し、無水酢酸 (0.4ml) を加えて室温にて15時間攪拌

した。反応液にエタノール（80ml）及びジイソプロピルエーテル（320ml）を加え、室温にて90分攪拌した後、沈析物を濾取し、エタノール／ジイソプロピルエーテル（1/4(v/v)、100ml）で洗浄することによって、1.56gのポリマーを得た。得られたポリマーをDMF（47ml）に溶解後、5%パラジウム－炭素（780mg）を加えて、35℃にて3時間加水素分解を行った。反応液にメタノール（90ml）及びセライト（8g）を加えて2時間攪拌したのち、5%パラジウム－炭素を濾別した。減圧下にてメタノールを留去したのち、エタノール（90ml）及びジイソプロピルエーテル（360ml）を加え、室温にて90分攪拌した。沈析物を濾取し、エタノール／ジイソプロピルエーテル（1/4(v/v)、100ml）で洗浄したのち、10%食塩水（100ml）に溶解した。1N水酸化ナトリウム水溶液にて溶解液のpHを10.0に調整後、十分洗浄したHP-20SSカラムクロマトグラフィー（三菱化学製、100ml）に通塔する。10%食塩水（300ml）、水（300ml）で洗浄後、50%含水アセトニトリル（300ml）で溶出した。目的化合物を含む画分を、更にイオン交換樹脂Dowex 50W(H⁺)（25ml）に通塔し、50%含水アセトニトリル（75ml）で洗浄した。溶出した溶液を減圧濃縮した後、凍結乾燥することによって、目的化合物（1.18g）を得た。

0.02N水酸化ナトリウムを用いた滴定値に基づく本化合物1分子中のグルタミン酸の重合数は約28であった。

【0042】

参考例2 分子量約12000のモノメトキシポリエチレングリコールと重合数が約7のポリグルタミン酸のブロック共重合体 N-アセチル化物の合成
片末端メトキシ基片末端3-アミノプロピル基のポリエチレングリコール（SUNBRIGHT MEPA-12T、日本油脂製、平均分子量12000、2.0g）をDMSO（40ml）に溶解後、γ-ベンジル L-グルタメート N-カルボン酸無水物（0.40g）を加えて35℃にて20時間攪拌した。反応液にエタノール（160ml）及びジイソプロピルエーテル（640ml）を加え、室温にて90分攪拌した後、沈析物を濾取し、エタノール／ジイソプロピル

エーテル（1/4 (v/v)、150ml）で洗浄した。得られた沈析物をDMF（40ml）に溶解し、無水酢酸（0.8ml）を加えて室温にて15時間攪拌した。反応液にエタノール（160ml）及びジイソプロピルエーテル（640ml）を加え、室温にて90分攪拌した後、沈析物を濾取し、エタノール/ジイソプロピルエーテル（1/4 (v/v)、150ml）で洗浄することによって、2.12gのポリマーを得た。得られたポリマーをDMF（64ml）に溶解後、5%パラジウム-炭素（1.06g）を加えて、35℃にて3時間加水素分解を行った。反応液にメタノール（130ml）及びセライト（14g）を加えて2時間攪拌したのち、5%パラジウム-炭素を濾別した。減圧下にてメタノールを留去したのち、エタノール（130ml）及びジイソプロピルエーテル（520ml）を加え、室温にて90分攪拌した。沈析物を濾取し、エタノール/ジイソプロピルエーテル（1/4 (v/v)、160ml）で洗浄したのち、10%食塩水（160ml）に溶解した。1N水酸化ナトリウム水溶液にて溶解液のpHを10.0に調整後、十分洗浄したHP-20SSカラムクロマトグラフィー（160ml）に通塔する。10%食塩水（480ml）、水（480ml）で洗浄後、50%含水アセトニトリル（480ml）で溶出した。目的化合物を含む画分を、更にイオン交換樹脂Dowex 50W(H⁺)（30ml）に通塔し、50%含水アセトニトリル（90ml）で洗浄した。溶出した溶液を減圧濃縮した後、凍結乾燥することによって、目的化合物（1.56g）を得た。0.02N水酸化ナトリウムを用いた滴定値に基づく本化合物1分子中のグルタミン酸の重合数は約7であった。

【0043】

【発明の効果】

本発明のカンプトテシン類の高分子誘導体は、化学的に分解しやすいフェニルエステル結合によりカンプトテシン類を結合させたことにより、生体内においても徐放性を有し、治療効果に優れた高分子誘導体である。更に、ミセルを形成する高分子誘導体は選択的に患部にて薬効を示し、副作用の少ないことが期待できる。又、酵素に依存しない生理活性物質の放出が可能であることは、治療効果の点で患者の個体差に影響されにくくと期待される。

【書類名】要約書

【要約】

【課題】治療効果が高く、癌化学療法に適したカンプトテシン類の水溶性誘導体が望まれている。

【解決手段】ポリエチレングリコール類とポリカルボン酸の重合体のカルボン酸基と、カンプトテシン類のフェノール性水酸基とを、エステル結合することにより、徐放性にも優れたカンプトテシン類の水溶性高分子誘導体を提供する。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-316942
受付番号	50201645072
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成14年11月 1日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年10月31日
-------	-------------

次頁無

出証特2003-3085669

特願 2002-316942

出願人履歴情報

識別番号 [000004086]

1. 変更年月日 1990年 8月 9日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都千代田区富士見1丁目11番2号
氏 名 日本化薬株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.